

اثرات داروهای ديازپام و اس‌سیتالوپرام بر استرس و بیان ژن‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در ماهی زبرا (*Danio rerio*) به عنوان جایگزین مدل انسانی

علی تهمتن‌نژاد عمران^۱، حامد منوچهری*^۲، رضا چنگیزی^۱، شهاب تیرگر فاخری^۱، محدثه نجارزاده^۱ و میثم رامشگر^۲

^۱گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۶

چکیده

افسردگی یک بیماری ذهنی است و طبق آمارها هر روز جدی‌تر می‌شود که نشان از نیاز روزافزون به تحقیق بر روی مدل‌های افسردگی و تولید داروهای ضدافسردگی دارد. هدف این تحقیق، ارزیابی تأثیرات منفرد و ترکیبی داروهای ديازپام و اس‌سیتالوپرام بر پارامترهای بیوشیمیایی و مولکولی در ماهی زبرا (*Zebrafish*) بوده است. در تحقیق حاضر جهت ایجاد افسردگی در ماهی‌های زبرا، از پروتکل استرس مزمن پیش‌بینی‌ناپذیر (Unpredictable Chronic Stress, UCS) استفاده شد. آزمایشات بیوشیمیایی با اندازه‌گیری کورتیزول با استفاده از تکنیک الایزا و آزمایشات مولکولی با بررسی بیان ژن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی با تکنیک Real-time PCR انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون آنالیز واریانس تکراری دوطرفه (ANOVA) و پس‌آزمون تاکی (Tukey's post hoc) استفاده شد. ديازپام، اس‌سیتالوپرام و ترکیب آن‌ها موجب پیشگیری از اثرات افسردگی با کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی (*mf-α, il-6*) و همچنین کاهش معنی‌دار سطوح کورتیزول (از $1,01 \pm 0,07$ نانوگرم کورتیزول بر گرم بافت به $0,61 \pm 0,12$ نانوگرم بر گرم بافت در تیمار ديازپام + اس‌سیتالوپرام) گردید. این پژوهش نشان می‌دهد پروتکل UCS موجب القای تغییرات نورواندوکرین متفاوتی در ماهی زبرا می‌گردد که با استفاده از داروهای آرامبخش و ضدافسردگی می‌توان اثرات نامطلوب آن را کاهش داد. همچنین این مطالعه استفاده از ماهی زبرا به عنوان ارگانیسم مدل در مطالعات تأثیرات رفتاری و فیزیولوژیک استرس را تقویت نمود و نشان داد که می‌توان از پروتکل UCS به عنوان یک ابزار آزمایشی کارآمد جهت ارزیابی داروهای جدید مورد استفاده در اختلالات روانی با منشاء استرس، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: افسردگی، ماهی زبرا، ديازپام، اس‌سیتالوپرام، پروتکل UCS

*نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: manouchehri@baboliau.ac.ir

مقدمه

افسردگی یک اختلال روانی جدی است که بر اساس آمارهای موجود، بیش از ۳۲۰ میلیون نفر از مردم جهان را تحت تأثیر قرار داده است. پاندمی کووید-۱۹ نیز موجب کاهش قابل توجهی در سلامت روانی افراد در سرتاسر دنیا شده است (۱۴، ۶۵، ۶۷). در پی این وضعیت، نیاز به توسعه داروهای ضدافسردگی جدید به یکی از چالش‌های عمده در حوزه پزشکی تبدیل شده است (۵۶). برای مطالعه آثار استرس بر سیستم‌های زیستی، از چندین ارگانیسم مدل استفاده شده است. ماهی زبرا (*Danio rerio*) به عنوان یک مدل ارزشمند در تحقیقات زیست‌پزشکی شناخته می‌شود. این ماهی به دلیل ویژگی‌هایی همچون حساسیت بالا به طیف وسیعی از داروهای ضدافسردگی، چرخه تولید مثل سریع، بدن شفاف در مراحل اولیه رشد، شباهت ژنتیکی و فیزیولوژیکی

قابل توجه به انسان، و هزینه‌های نگهداری کم، یک مدل مناسب برای آزمایش داروهای موثر بر سیستم عصبی مرکزی به شمار می‌آید (۱۵، ۲۴، ۳۲). در این مطالعه، برای القای افسردگی در ماهی زبرا، از پروتکل استرس مزمن پیش‌بینی‌ناپذیر (Unpredictable Chronic Stress, UCS) استفاده شد. این پروتکل با استفاده از القای مداوم عوامل استرس‌زای متفاوت، تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی مشابه با وضعیت افسردگی انسانی را القا می‌کند و نشان‌دهنده ارتباط معنادار آن با افسردگی است. این پروتکل توسط پیاتو و همکاران در سال ۲۰۱۱ برای بررسی تغییرات رفتاری در ماهی زبرا طراحی شد (۵۳).

داروهای ضدافسردگی به طور گسترده‌ای برای درمان اختلالات روانی متنوع به کار می‌روند و به طور مداوم در آب‌های سطحی مناطق پرجمعیت یافت می‌شوند. وجود مقادیر این داروها در محصولات دریایی ممکن است تأثیرات متفاوتی بر مصرف‌کنندگان آن‌ها داشته باشد که باید مورد توجه قرار گیرد (۶، ۱۱، ۲۷).

مصرف گسترده این داروها در جوامع انسانی، لزوم تحقیق بیشتر در خصوص آثار احتمالی آن‌ها را برای ارزیابی اثرات منفی بر مصرف‌کنندگان آن‌ها ایجاب می‌کند. دیازپام از داروهای آرامبخش بنزودیازپینی (Benzodiazepine) است (۲۵) که با اتصال به گیرنده‌های $GABA_A$ (Gamma Amino Butyric acid, GABA)، انتقال $GABA_{ergic}$ را افزایش داده و اثر آرامبخش خود را از این طریق اعمال می‌کند (۲۱). در همین راستا، چن و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثرات دزهای مزمن دیازپام بر تغییرات میانجی‌های عصبی و رفتارهای ماهی زبرا را مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها تأثیر این دارو بر تغییرات رفتاری را تأیید کردند (۱۴). سیتالوپرام از داروهای ضدافسردگی مهارکننده انتخابی بازجذب سروتونین (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) است که با افزایش سطح سروتونین در سیستم عصبی اثرات ضدافسردگی خود را نشان می‌دهد (۵۱). این دارو مخلوطی از دو استریوایزومر به نام‌های اس (S - Citalopram) و آر (R - Citalopram) است و اثر اصلی آن به ایزومر اس نسبت داده می‌شود (۸). در این زمینه، نیلسن و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثرات سیتالوپرام بر رفتار ماهی زبرا را بررسی کرده و تغییرات رفتاری ناشی از دزهای مختلف این دارو را نشان دادند (۵۲). با وجود کاربرد گسترده داروهای ضدافسردگی، اطلاعات کافی در مورد اثرات دقیق آن‌ها بر مسیرهای زیستی و رفتاری در مدل‌های جانوری تحت استرس مزمن وجود ندارد. هدف این مطالعه، ارزیابی تأثیرات منفرد و ترکیبی داروهای آرامبخش و ضدافسردگی پرمصرف دیازپام و اس‌سیتالوپرام بر پارامترهای بیوشیمیایی (کورتیزول تام بدن) و مولکولی (بیان ژن‌های التهابی و پیش‌التهابی مانند $tnf-\alpha$, $il-6$, $il-10$) در ماهی زبرا تحت پروتکل UCS به ویژه با هدف گسترش اطلاعات در خصوص ویژگی‌های این پروتکل بوده است.

مواد و روش‌ها

• تیمارهای مورد آزمایش

در این مطالعه از ۳۸۴ ماهی زبرا بالغ از سویه باله‌کوتاه (Short-fin) ۶ ماهه و مخلوط نر و ماده استفاده شد. ماهی‌ها در ۲۴ آکواریوم شیشه‌ای ۱۰ لیتری (۱۶ ماهی در هر آکواریوم؛ معادل ۱,۶ ماهی در لیتر) توزیع شدند. آکواریوم‌ها با آب دکلره‌شده پر شدند. برای دکلره کردن، از آب ذخیره‌شده به مدت حداقل ۴۸ ساعت در دمای اتاق استفاده شد و از هیچ‌گونه ترکیب شیمیایی دکلره‌کننده مانند سدیم تیوسولفات استفاده نشد تا از ایجاد استرس شیمیایی احتمالی جلوگیری شود. ماهی‌ها چرخه روشنایی تاریکی ۱۴ به ۱۰ ساعت داشتند (روشن شدن چراغ‌ها ساعت ۷ صبح) و ۱ هفته قبل از شروع آزمایش جهت سازگاری در این شرایط نگهداری شدند. در تمام آکواریوم‌ها (شامل گروه‌های دارای استرس و فاقد استرس)، از سیستم فیلتراسیون مکانیکی و بیولوژیکی مشابه برای حفظ کیفیت آب استفاده شد. سیکل نیتروژن به‌طور کامل تثبیت شده بود و پارامترهای شیمیایی آب از

اس سیتالوپرام ($\mu\text{g/L}$)	۰	۰	۰	۰	۱,۵	۱,۵	۱,۵	۱,۵
---	---	---	---	---	-----	-----	-----	-----

عوامل استرس‌زای القا شده شامل موارد زیر بود؛

- گرم کردن آب تانک تا 33°C به مدت ۳۰ دقیقه

- سرد کردن آب تانک تا 23°C به مدت ۳۰ دقیقه

- انتقال ۱۰ ماهی در یک ظرف با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر به مدت ۵۰ دقیقه

- کاهش سطح آب آکواریوم به مدت ۲ دقیقه به طوری که سطح پشتی بدن ماهی نمایان شود.

- تعویض تانک ۳ بار متوالی با فاصله ۳۰ دقیقه

- تعقیب نمودن ماهی با توری به مدت ۸ دقیقه

بر اساس پروتکل UCS، این عوامل استرس‌زا به صورت تصادفی ۲ بار در روز (از ساعت ۸ صبح تا ۱۸ عصر) و طی ۲۱ روز (روز ۲ دی تا روز ۲۲ دی ماه سال ۱۴۰۳ در آزمایشگاه تحقیقات ماهی زبرا واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل) به منظور جلوگیری از خوگیری و عادت نمودن ماهی‌ها اعمال شد.

● اندازه‌گیری کورتیزول

اندازه‌گیری کورتیزول تام بدن، بر اساس تحقیقات قبلی و با استفاده از کیت الایزا (EIA gen CORTISOL test, Biochem Immuno Systems) صورت گرفت (۵۳، ۶۸). به طور خلاصه، ۲۴ ساعت پس از اعمال آخرین عامل استرس‌زا، ماهی‌ها با ملایمت گرفته شده و فوراً در نیتروژن مایع فریز شدند. به دنبال آن در دمای 20°C - نگهداری شدند تا از آن‌ها عصاره کورتیزول گرفته شود. برای جلوگیری از پاسخ استرس احتمالی ناشی از دستکاری و گرفتن ماهی‌ها، مدت زمان مابین گرفتن ماهی تا کشتن آن، کمتر از ۱۰ ثانیه بود (۴۳). هر ماهی زبرا وزن شد و هر مخزن حاوی ۲ ماهی خرد شده بود و درون کیسه استامکر با ۲ میلی‌لیتر بافر سالین فسفات (PBS, pH = 7.4) برای ۶ دقیقه قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه هوموژنایزر (T10 Basic Ultra turrax, IKA, Germany)، به خوبی هوموژن و یکنواخت شد (۶۸). سپس دی‌اتیل اتر اضافه نموده و نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ (rpm) سانتریفیوژ شدند. پس از آن فوراً در نیتروژن مایع فریز شدند. قسمتی که پس از فرو بردن در نیتروژن مایع یخ نزنه بود (دی‌اتیل اتر حاوی کورتیزول)، به آهستگی درون دکانتور خالی شد. دی‌اتیل اتر حاوی کورتیزول به درون یک لوله جدید منتقل شد و به طور کامل تحت یک جریان بخار نیتروژن ملایم برای ۲ ساعت، تبخیر گردید. آنچه باقی ماند، یک عصاره لیپیدی حاوی کورتیزول بود. تست الایزا روی سوسپانسیون نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر بافر سالین فسفات عمل‌آوری شد (۵۳).

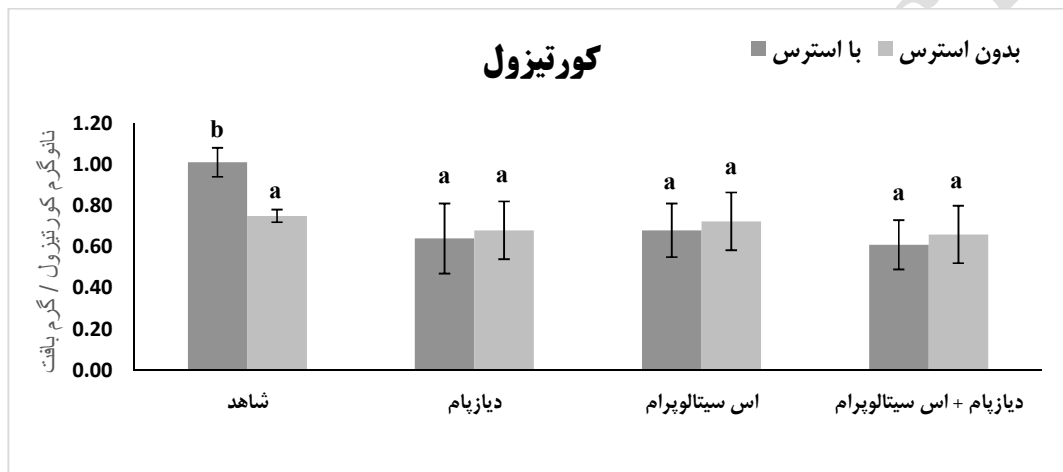
● بیان ژن

در این تحقیق جهت ارزیابی میزان بیان ژن‌های IL-6 ، IL-10 و COX-2 از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از اعمال آخرین عامل استرس‌زا، تیمارهای مورد آزمایش با ملایمت گرفته شده و با استفاده از نیتروژن مایع، کشته شدند. سپس مغز آن‌ها زیر لوپ مطابق با روش مارکون و همکاران (۴۳) بیرون آورده شد. مغزها درون تیوب‌هایی قرار گرفته و درون تانک ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید. سه ارزیابی مستقل برای هر گروه انجام شد و از بسته‌های حاوی سه مغز

ماهی له‌شده جهت انجام هر آزمایش مستقل استفاده شد. پروتکل استفاده شده توسط آزمایشگاه بر اساس تحقیقات پیشین (۹) انجام شد. در این پژوهش از ژن‌های $e1f1-\alpha$ و β -actin به عنوان ژن مرجع یا Housekeeping استفاده شد. طراحی پرایمرها نیز بر اساس تحقیقات پیشین (۲۳، ۳۶، ۵۹، ۶۲) تعیین گردید. برای اندازه‌گیری کورتیزول و بررسی بیان ژن، از گروه‌های جداگانه ماهی‌ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

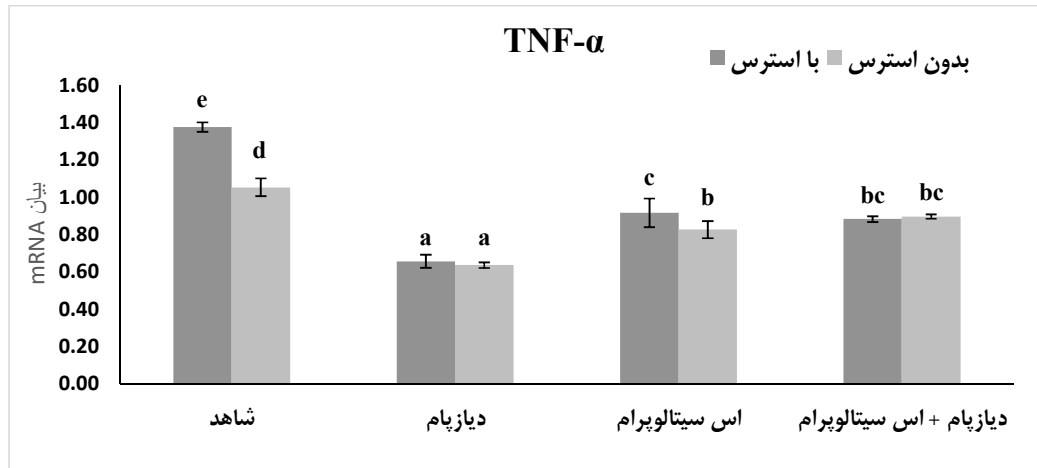
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس تکراری دوطرفه (ANOVA) و پس‌آزمون تاکی (Tukey's post hoc) استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شدند. تمامی نتایج با میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین توصیف شدند. همچنین در همه محاسبات سطح معنی‌داری اختلاف $p < 0,05$ محسوب شد.



نتایج

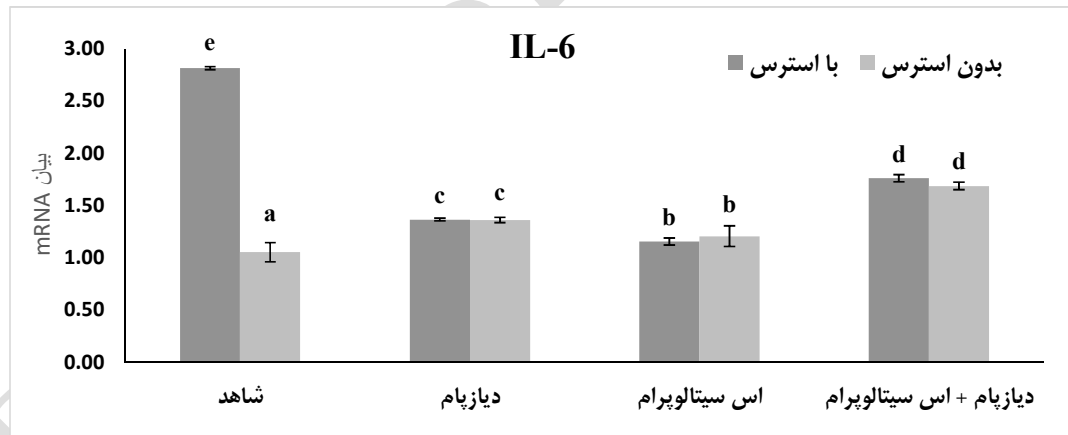
نمودار ۱- نتایج اندازه‌گیری سطوح کورتیزول. ستون‌ها میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین را نشان می‌دهند. گروه‌هایی که حروف متفاوت دارند، دارای تفاوت آماری معنی‌داری ($p < 0,05$) با هم هستند.

بر اساس نمودار ۱ پروتکل UCS در تیمار شاهد با استرس، موجب افزایش معنی‌دار سطوح کورتیزول شده است. سطوح کورتیزول تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، اس‌سیتالوپرام و همچنین ترکیب آن‌ها، به شکل معنی‌داری از تیمار شاهد با استرس کمتر است ($P < 0,05$). اختلاف معنی‌داری بین سطوح کورتیزول تیمارهای با استرس و بدون استرس داروها مشاهده نمی‌گردد ($P > 0,05$).



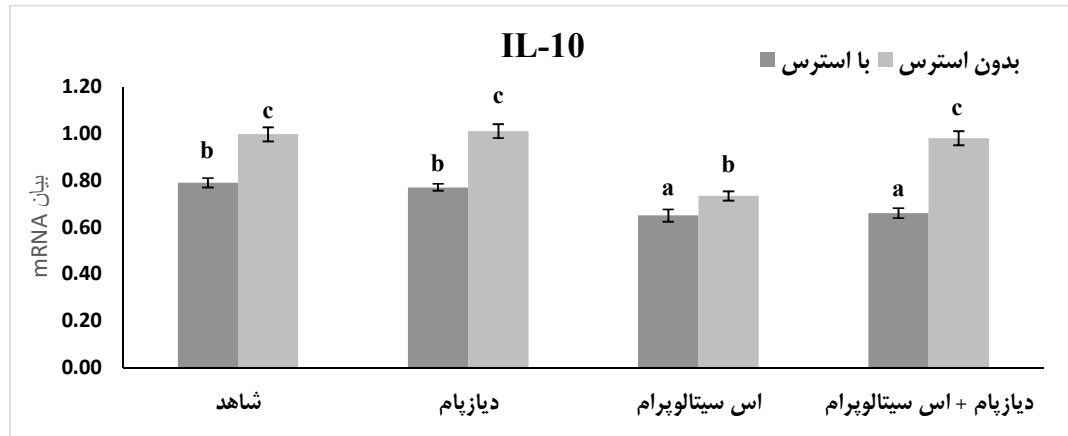
نمودار ۲- نتایج آنالیز بیان ژن TNF- α . ستون‌ها میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین را نشان می‌دهند. گروه‌هایی که حروف متفاوت دارند، دارای تفاوت آماری معنی‌داری ($p < 0,05$) با هم هستند.

مطابق نمودار ۲ در میزان بیان ژن TNF- α تفاوت معنی‌داری در تیمار با و بدون استرس Diazepam و تیمار ترکیبی Diazepam و اس سیتالوپرام مشاهده نمی‌شود ($P > 0,05$). در میزان بیان این ژن در تیمار با و بدون استرس دارای اثر اس سیتالوپرام، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0,05$). به طور کلی در میان این تیمارها، تیمارهای با و بدون استرس دارای اثر Diazepam، بیشترین اثر مهاري در بیان ژن TNF- α مشاهده شد.



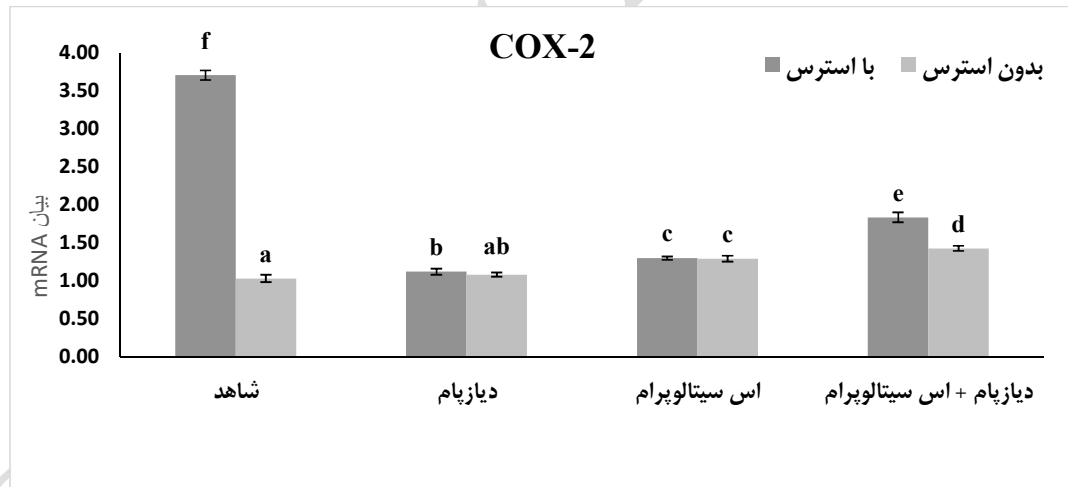
نمودار ۳- نتایج آنالیز بیان ژن IL-6. ستون‌ها میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین را نشان می‌دهند. گروه‌هایی که حروف متفاوت دارند، دارای تفاوت آماری معنی‌داری ($p < 0,05$) با هم هستند.

مطابق نمودار ۳ در میزان بیان ژن IL-6 تیمار Diazepam با و بدون استرس، اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ($P > 0,05$). در تیمار اس سیتالوپرام با و بدون استرس نیز تفاوت معنی‌داری در میزان بیان این ژن مشاهده نمی‌گردد ($P > 0,05$). میزان بیان ژن IL-6 در تیمارهای با و بدون استرس Diazepam و اس سیتالوپرام، تفاوت معنی‌داری با هم ندارد ($P > 0,05$). در میان تمامی تیمارها، اس سیتالوپرام با و بدون استرس، بیشترین اثر مهاري را بر بیان ژن IL-6 داشته است. همچنین تیمار ترکیبی Diazepam و اس سیتالوپرام، کمترین اثر مهاري را بر بیان این ژن دارد.



نمودار ۴- نتایج آنالیز بیان ژن IL-10. ستون‌ها میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین را نشان می‌دهند. گروه‌هایی که حروف متفاوت دارند، دارای تفاوت آماری معنی‌داری ($p < 0.05$) با هم هستند.

مطابق نمودار ۴ در میزان بیان ژن IL-10 میان تمامی تیمارهای با استرس نسبت به تیمارهای بدون استرس، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$). بین تیمارهای با و بدون استرس دیازپام و اس سیتالوپرام تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌گردد ($P < 0.05$). در تیمار ترکیبی دیازپام و اس سیتالوپرام با استرس و بدون استرس نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$). در میان تیمارهای دارای اثر استرس و کاربرد داروها، در تیمار دیازپام بیشترین بیان ژن IL-10 مشاهده شد.



نمودار ۵- نتایج آنالیز بیان ژن COX-2. ستون‌ها میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین را نشان می‌دهند. گروه‌هایی که حروف متفاوت دارند، دارای تفاوت آماری معنی‌داری ($p < 0.05$) با هم هستند.

مطابق نمودار ۵ در میزان بیان ژن COX-2 تیمارهای دیازپام و اس سیتالوپرام با و بدون استرس، اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ($P > 0.05$). در تیمار ترکیبی دیازپام و اس سیتالوپرام، میزان بیان ژن تیمار با استرس نسبت به تیمار بدون استرس، دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد ($P < 0.05$). در میزان بیان ژن شاهد با استرس نسبت به سایر تیمارها، تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌گردد ($P < 0.05$). بیشترین اثر مهارتی بر بیان ژن COX-2 در بین این تیمارها، مربوط به دیازپام با و بدون استرس است که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری دارد ($P < 0.05$).

بحث

رابطه سطوح کورتیزول با مصرف ديازپام و اس‌سیتالوپرام در ماهی زبرا

استرس در ماهی زبرا موجب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اندام درون کلیوی (Hypothalamus-Pituitary-Intrarenal axis, HPI) می‌شود و در مدت زمان طولانی (حداقل یک هفته) می‌تواند منجر به القای افسردگی گردد (۶۸). در مدل‌های ماهی زبرا، تغییرات سطوح کورتیزول ارتباط مستقیمی با رفتار استرسی دارند (۲۰). افزایش سطوح کورتیزول پس از اجرای پروتکل استرس مزمن پیش‌بینی ناپذیر (UCS) مشاهده می‌شود (۵۳). مطابق با نتایج تحقیق حاضر، سطح کورتیزول در گروه‌های تحت تیمار با استرس به‌طور معناداری بالاتر از گروه‌های شاهد بدون استرس بود ($P < 0.05$) (نمودار ۱). این یافته‌ها تأییدکننده صحت اجرای پروتکل UCS و همخوانی آن با نتایج پیشین هستند (۴۳، ۶۸). در مقایسه با گروه شاهد با استرس، سطوح کورتیزول در گروه‌های تیمار شده با ديازپام، اس‌سیتالوپرام و ترکیب ديازپام و اس‌سیتالوپرام به‌طور معناداری کاهش یافت ($P < 0.05$). این نتایج نشان‌دهنده اثرات مثبت این داروها در کاهش سطوح استرس پایه در ماهی زبرا هستند.

علاوه بر این، عدم مشاهده تفاوت معنادار در سطوح کورتیزول بین گروه‌های تحت تیمار با استرس و بدون استرس و گروه شاهد بدون استرس نشان‌دهنده این است که کورتیزول در ماهی زبرا دارای یک سطح پایه فیزیولوژیک است. مصرف دزهای درمانی ديازپام و اس‌سیتالوپرام طی یک دوره حداقل سه‌هفته‌ای نمی‌تواند سطوح کورتیزول را از این مقدار پایه‌ای کاهش دهد (۵۵). این موضوع با یافته‌های مارکون و همکاران (۲۰۱۶) که سطوح پایه‌ای کورتیزول را در آزمایشات با پروتکل UCS در مدت زمان‌های یک و دو هفته ثبت کرده‌اند، همخوانی دارد (۴۳).

یکی دیگر از عواملی که بر اثرات ضداضطرابی این داروها تأثیرگذار است، مدت زمان تیمار می‌باشد (۳۰). این موضوع در ارتباط با نقش مسیرهای مونوآمینرژیک، به‌ویژه مسیرهای سروتونرژیک در تنظیم اضطراب است. اعصاب سروتونرژیک در دستگاه عصبی بر بخش‌های مؤثر بر اضطراب، مانند محور HPI تأثیرگذار هستند (۶۰). بنابراین، برای بررسی دقیق‌تر این موضوع، لازم است تحقیقات با دوره زمانی بیشتر از سه هفته انجام شود.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که ديازپام، اس‌سیتالوپرام و ترکیب این دو دارو در کاهش سطوح کورتیزول به‌ویژه در گروه‌های تحت استرس مؤثر بوده‌اند. با این حال، هیچ‌کدام از این داروها نتوانستند سطوح کورتیزول را پایین‌تر از سطح پایه آن در ماهی زبرا کاهش دهند. این یافته‌ها با تحقیقات قبلی که اثرات آرامبخش بنزودیازپینی‌ها و داروهای ضدافسردگی بر پارامترهای نورواندوکرین در جوندگان (۶۶) و انسان‌ها (۵۴) را بررسی کرده‌اند، هم‌راستا هستند.

بیان ژن ماهی زبرا تحت تأثیر ديازپام و اس‌سیتالوپرام

شواهد اساسی و محکمی وجود دارد که نقش سیستم ایمنی را در پاتورژن افسردگی نشان می‌دهد و از رابطه بین استرس و التهاب عصبی (Neuroinflammation) حکایت دارد (۴۰، ۳۵). این شواهد ما را به سمت فرضیه سایتوکاینی یا التهابی افسردگی سوق می‌دهد. این فرضیه بیان می‌دارد که فعالیت بیش از حد طولانی‌مدت سیستم پاسخ التهابی (IRS, System Response Inflammatory) در پاسخ به شرایط استرس‌زا، به ایجاد افسردگی می‌انجامد. بر اساس این فرضیه، افزایش فعالیت محور HPI موجب افزایش فعالیت دستگاه ایمنی محیطی (System Immune Peripheral) می‌گردد (۱). از طرفی، افزایش فعالیت دستگاه ایمنی محیطی موجب افزایش ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی (Proinflammatory Cytokines) از اجزای این دستگاه شده و در نهایت

موجب ایجاد تغییرات رفتاری، نورواندوکراین و نوروشیمیایی مربوط به افسردگی می‌گردد (۳۸، ۵۰). بنابراین، اندازه‌گیری میزان بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی می‌تواند به عنوان معیاری مناسب جهت ارزیابی اثرات افسردگی استفاده شود. در همین زمینه، دانترز و کلی در سال ۲۰۰۷ بر روی تاثیرات رفتاری القا شده توسط سایتوکاین‌ها تحقیق کردند. آنان اثرات القایی سایتوکاین‌ها را در بروز تغییرات رفتاری ناشی از افسردگی بسیار مهم توصیف کردند (۱۷). بر اساس فرضیه التهابی، فعال شدن دستگاه ایمنی محیطی (Peripheral Immune System) موجب ترشح سایتوکاین‌هایی از اجزای این سیستم می‌شود که در تغییرات نورواندوکراین و نوروشیمیایی مرتبط با افسردگی نقش دارد (۵۸). تاثیرات سایتوکاین‌ها بر فیزیولوژی مغز بسیار پیچیده و متنوع است. سایتوکاین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها نقش مکملی در فرآیندهای تغییرات رفتاری و علائم عصبی دارند (۴۶). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، نقش رهاکننده و ماشه‌مانند (Trigger) را در پاتوژنز افسردگی دارند (۳۷، ۴۱). واسطه بین اثر ماشه‌مانند سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و افزایش فعالیت محور HPI که موجب بروز اثرات افسردگی می‌شود، سیستم‌های نورواندوکراین و نوروترانسمیترها می‌باشند (۳۸). اثر القایی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی موجب افزایش فعالیت محور HPI می‌گردد که نتیجه آن افزایش غلظت کورتیکوستروئیدها، به‌ویژه کورتیزول است. افزایش ترشح کورتیکوستروئیدها موجب تحریک شدید گیرنده‌های کورتیکوستروئیدی در هیپوتالاموس و هیپوفیز می‌گردد. مکانیسم فیدبک منفی باعث می‌شود این تحریک شدید موجب کاهش سنتز هورمون‌های CRH و ACTH گردد. در نتیجه، میزان تحریک‌پذیری محور HPI محدود می‌شود (۵۷).

TNF- α یک سایتوکاین پیش‌التهابی است. این سایتوکاین موجب تحریک بیان ژن و ترشح هورمون CRH از هسته‌های پاراونتریکولار (Paraventricular Nucleus, PVN) هیپوتالاموس می‌گردد (۲۹). هسته‌های پاراونتریکولار هیپوتالاموس مرکز کنترل محور HPI هستند و موجب انتقال، تغییر و تبدیل سروتونین و نوراپی‌نفرین در هیپوتالاموس، آمیگدال، هیپوکامپ و کورتکس پری‌فرونتال می‌گردند (۲، ۵). پروتکل UCS باعث افزایش بیان ژن کدکننده این سایتوکاین می‌شود (۱۶، ۱۷). مطابق با نمودار ۲ در این تحقیق، میزان بیان ژن TNF- α در تیمار شاهد با استرس بیشتر از شاهد بدون استرس بود که نشان‌دهنده درستی عملکرد پروتکل UCS بوده و با تحقیقات قبلی پیاتو و همکاران و مارکون و همکاران مطابقت دارد (۴۳، ۵۳). همچنین میزان بیان ژن TNF- α در تیمارهای با و بدون استرس دیازپام، اس‌سیتالوپرام و ترکیب دیازپام و اس‌سیتالوپرام، علاوه بر شاهد با استرس از شاهد بدون استرس نیز به‌طور معنی‌داری کمتر بوده است ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده اثربخشی مطلوب این داروها در ممانعت از بیان ژن این سایتوکاین پیش‌التهابی و جلوگیری از التهاب است. تیمارهای با و بدون استرس دیازپام بیشترین اثر مهارری را بر بیان ژن‌های کدکننده TNF- α داشته‌اند. با توجه به اینکه در تحقیقات پیشین که در آن از پروتکل UCS طی مدت زمان کمتر از ۳ هفته استفاده شد (۴۳، ۵۳، ۶۸) الگوی متفاوتی مشاهده شد، پیش‌بینی می‌شود که با افزایش طول دوره آزمایش، تغییرات بیشتری در این الگو مشاهده گردد.

IL-6 نیز یک سایتوکاین پیش‌التهابی است. بیان این ژن در تیمار شاهد با استرس به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بدون استرس است ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده اثرات تحریکی پروتکل UCS بر بیان ژن‌های پیش‌التهابی است و با تحقیقات پیشین همخوانی دارد (۴۸). مطابق با نمودار ۳، در این تحقیق تمامی داروها توانسته‌اند میزان بیان این ژن را به‌طور معنی‌داری کاهش دهند که نشان‌دهنده اثر مطلوب آن‌ها در کاهش استرس و جلوگیری از افسردگی است.

IL-10 یک سایتوکاین ضدالتهابی است و نقش تعدیل‌کننده و کاهشی در سطوح پایه استرس دارد. بر اساس تحقیقات پیشین (۱۹، ۴۵)، IL-10 موجب کاهش رفتار استرسی و در نهایت کاهش افسردگی می‌شود. در این آزمایش، میزان بیان ژن IL-10 در

تیمارهای شاهد با استرس به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بدون استرس بود ($P < 0.05$). این امر نشان‌دهنده تأثیر پروتکل UCS در مهار بیان ژن IL-10 است که مطابق با یافته‌های قبلی است (۴۳). همچنین در تمامی موارد، میزان بیان ژن IL-10 در تیمارهای بدون استرس بیشتر از تیمارهای با استرس بود. این امر نیز شواهدی بر اثرات سرکوب‌کننده استرس بر بیان ژن IL-10 و مطابق با یافته‌های پیشین است (۴). از آنجایی که IL-10 یک سایتوکاین ضدالتهابی است و داروهای مورد استفاده در تحقیق حاضر نیز دارای اثرات ضدالتهابی و مهارکننده استرس هستند، انتظار می‌رود که داروها موجب افزایش بیان ژن IL-10 گردند. اما نتایج موارد دیگری را نشان داد.

در تحقیقات مائز، مصرف داروهای آرامبخش و ضدافسردگی موجب کاهش میزان بیان ژن IL-10 شده است (۳۸). در پژوهش‌های فورنارو و همکاران تفاوت معنی‌داری میان میزان بیان ژن تیمارهایی که این داروها را مصرف کرده بودند، مشاهده نشد (۲۶). در پژوهش‌های کاربونی و همکاران نیز مصرف این داروها موجب افزایش بیان ژن IL-10 گردید (۱۲). هرچند علت دقیق این تفاوت چشمگیر همچنان به‌طور کامل مشخص نشده است، اما محققان دلایلی را برای آن ذکر کرده‌اند. مائز و همکاران عقیده دارند علت کاهش بیان ژن IL-10، فعال شدن سیستم Compensatory Inflammatory Reflex System (CIRS) در برخی موارد است. فرضیه‌ای مطرح شده است که بیان می‌دارد سیستم CIRS دارای نقشی ضدتنظیمی (Counter-regulatory) روی سایتوکاین‌ها است و اثر آن ممکن است در برخی موارد موجب کاهش بیان ژن IL-10 گردد (۳۹). بنا بر این و همچنین برینشیک و همکاران، این مورد را با فرضیه نوروتروفیک افسردگی توجیه می‌کنند. این محققان طی تحقیقات خود نتیجه گرفتند که کاهش میزان بیان ژن IL-10 در برخی موارد، جهت ایجاد تعادل میان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی و نگاه داشتن آن‌ها در سطوح فیزیولوژیک است تا انعطاف‌پذیری نوروئی (Neuronal Plasticity) در سطح مطلوبی بماند و ارتباطات ساختاری مغز در واکنش به استرس آسیبی نبیند (۳، ۷). مارتینوویچ و لو طی تحقیقات خود نتیجه گرفتند که میزان بیان ژن IL-10 بسته به زمان می‌تواند متفاوت باشد. علاوه بر این، مارتینوویچ و لو و همچنین جوادیان طی تحقیقات خود استدلال نمودند که تأثیرات داروهای مهارکننده بازجذب سروتونین مانند اس سیتالوپرام، موجب ایجاد تغییراتی در انعطاف‌پذیری سیناپسی (Synaptic Plasticity) می‌شود. این تغییرات به تدریج و در طول مدت زمان زیادی اتفاق می‌افتد و پس از آن اثرات بیان ژن بروز می‌یابد (۱۸، ۴۴). ویدلوجا و همکاران طی تحقیقات خود این‌گونه استنتاج نمودند که کاهش بیان ژن IL-10 خود جزئی از مکانیسم‌های پیچیده دیگری است که نیازمند تحقیقات بیشتری است (۶۴).

COX-2 یکی از دو ایزوفرم آنزیم سیکلوکسیژناز (COX) است که در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین‌ها نقش دارد. مطالعات والکو و همکاران نقش کلیدی COX-2 را در پاتوفیزیولوژی افسردگی برجسته کرده است (۶۱). علاوه بر این، تحقیقات مینگتی نشان داده است که COX-2 ممکن است در فرآیندهای نورودژنراتیو مرتبط با فیزیولوژی مغز دخالت داشته باشد (۴۷). بیان این آنزیم توسط سایتوکاین‌های التهابی القا می‌شود (۳۴) و به نوبه خود، COX-2 می‌تواند بر تنظیم بیان ژن‌های این سایتوکاین اثرگذار باشد. محصول اصلی COX-2، یعنی پروستاگلاندین E2 (PGE2)، نقش مهمی در تقویت تولید سایتوکاین‌هایی مانند IL-6 دارد (۳۱، ۴۹). افزایش غلظت PGE2 در بیماران مبتلا به افسردگی گزارش شده است و مصرف داروهای ضدافسردگی می‌تواند این افزایش را تعدیل کند (۱۰). اهمیت این آنزیم در افسردگی زمانی آشکار شد که مهارکننده‌های COX-2 اثربخشی درمانی در مدل‌های آزمایشگاهی افسردگی نشان دادند. همچنین، مطالعات قبلی افزایش بیان ژن COX-2 در هیپوکامپ مدل‌های حیوانی تحت استرس مزمن را گزارش کرده‌اند (۱۳). بنابراین، پژوهشگران به‌طور فزاینده‌ای به دنبال توسعه داروهای ضدالتهابی هدفمند علیه COX-2 به عنوان رویکردی نوین برای درمان افسردگی هستند (۲۲). در این مطالعه مطابق نمودار ۵، افزایش معنی‌دار بیان

ژن COX-2 در گروه شاهد تحت استرس در مقایسه با گروه شاهد بدون استرس مشاهده شد ($P < 0.05$)، که نشان‌دهنده اثربخشی پروتکل UCS و هم‌راستا با یافته‌های پیشین است (۴۳، ۵۳). در گروه‌های تحت تیمار دیاپام، چه با استرس و چه بدون استرس، بیان ژن COX-2 کاهش یافت. این یافته نشان می‌دهد که دیاپام طی دوره ۳ هفته‌ای آزمایش بیشترین اثر مهاری را بر بیان این ژن داشته است. این نتایج با مطالعات هانستاد و همکاران و کلر و همکاران همخوانی دارد که کاهش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را در مدل‌های حیوانی و انسانی تحت استرس مزمن پس از درمان با داروهای ضدافسردگی نشان داده‌اند (۲۸، ۳۳). یافته‌های این پژوهش نیز این اثرات را تأیید می‌کند.

با وجود تمامی پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه سایتوکاین‌ها و رابطه آن‌ها با افسردگی، همچنان کاملاً مشخص نشده است که افسردگی نتیجه پاسخ مغز به استرس مزمن یا حاد است یا تغییر خاص در سایتوکاین‌ها موجب ایجاد افسردگی می‌شود (۶۳). از همین رو، ظرفیت پژوهشی بسیار زیادی در این زمینه وجود دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

ماهی زبرا یک ارگانیسم مدل بسیار مناسب برای مطالعه تأثیرات استرس بر روی پارامترهای فیزیولوژیک است و ظرفیت فوق‌العاده زیادی برای انجام پژوهش‌های دیگر دارد. می‌توان از پروتکل UCS به عنوان یک ابزار آزمایش جهت ارزیابی داروهای جدید موثر بر استرس، افسردگی و به طور کلی داروهای موثر بر اعصاب استفاده نمود. تحقیقات بیشتری نیاز است تا بتوان این پروتکل را در ماهی زبرا گسترش داد. گسترش این پروتکل می‌تواند در مطالعه مکانیسم‌های نورولوژیک بسیار پیچیده و اختلالات روانی، برای محققان راهگشا باشد.

دیاپام و اس‌سیتالوپرام و ترکیب آن‌ها موجب کاهش معنی‌دار سطوح کورتیزول می‌شوند. همچنین این داروها موجب کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی TNF- α و IL-6 و ژن کدکننده COX-2 می‌شوند ($P < 0.05$). همان‌طور که پیش از این اشاره شد، افسردگی دارای پاتوفیزیولوژی بسیار پیچیده‌ای است که در آن ارتباطات فراوانی میان سیستم‌های مختلف عصبی، اندوکراین و ایمنی دیده می‌شود. در این تحقیق بخش بسیار کوچکی از این ارتباطات بررسی گردید.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

ملاحظات اخلاقی

نگهداری ماهی‌های زبرا و انجام آزمایشات بر روی آن‌ها، با تایید و نظارت کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل انجام شد. شناسه اخلاق این پژوهش به شماره IR.IAU.BABOL.REC.1403.025 در وبگاه سامانه ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی، قابل مشاهده می‌باشد.

منابع

1. Alsop D, Vijayan M. 2009. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General and Comparative Endocrinology*. 161(1):62-6.
2. Ando T, Dunn AJ. 1999. Mouse tumor necrosis factor- α increases brain tryptophan concentrations and norepinephrine metabolism while activating the HPA axis in mice. *Neuroimmunomodulation*. 6(5):319-29.
3. Benarroch EE. 2013. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*. 81(12):1079-88.

4. Bluthé R-M, Castanon N, Pousset F, Bristow A, Ball C, Lestage J, et al. 1999. Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 24(3):301-11.
5. Brebner K, Hayley S, Zacharko R, Merali Z, Anisman H. 2000. Synergistic effects of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α : central monoamine, corticosterone, and behavioral variations. *Neuropsychopharmacology*. 22(6):566-80.
6. Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J. 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*. 339(6121):814-5.
7. Brynskikh A, Warren T, Zhu J, Kipnis J. 2008. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 22(6):861-9.
8. Burke WJ, Kratochvil CJ. 2002. Stereoisomers in psychiatry: the case of escitalopram. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*. 4(1):20.
9. Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. 2013. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nature Methods*. 10(11):1063-7.
10. Calabrese JR, Skwerer RG, Barna B, Gullledge AD, Valenzuela R, Butkus A, et al. 1986. Depression, immunocompetence, and prostaglandins of the E series. *Psychiatry Research*. 17(1):41-7.
11. Calisto V, Domingues MRM, Esteves VI. 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments—Kinetics and photodegradation products. *Water Research*. 45(18):6097-106.
12. Carboni L, McCarthy DJ, Delafont B, Filosi M, Ivanchenko E, Ratti E, et al. 2019. Biomarkers for response in major depression: comparing paroxetine and venlafaxine from two randomised placebo-controlled clinical studies. *Translational Psychiatry*. 9(1):182.
13. Cassano P, Hidalgo A, Burgos V, Adris S, Argibay P. 2006. Hippocampal upregulation of the cyclooxygenase-2 gene following neonatal clomipramine treatment (a model of depression). *The Pharmacogenomics Journal*. 6(6):381-7.
14. Chen K, Wu M, Chen C, Xu H, Wu X, Qiu X. 2021. Impacts of chronic exposure to sublethal diazepam on behavioral traits of female and male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 208:111747.
15. Clark D, Pazdernik N, McGehee M. 2019. Cells and organisms. *Molecular Biology*, 3rd ed; Clark, DP, Pazdernik, NJ, McGehee, MR, Eds.:2-37.
16. Dantzer R. 2006. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurologic Clinics*. 24(3):441-60.
17. Dantzer R, Kelley KW. 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*. 21(2):153-60.
18. Djavadian R. 2004. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 64(2):189-200.
19. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*. 67(5):446-57.
20. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. 205(1):38-44.
21. Eghbali M, Curmi J, Birnir B, Gage P. 1997. Hippocampal GABAA channel conductance increased by diazepam. *Nature*. 388(6637):71-5.
22. Eyre HA, Air T, Proctor S, Rositano S, Baune BT. 2015. A critical review of the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 57:11-6.
23. Faikoh EN, Hong Y-H, Hu S-Y. 2014. Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*. 38(1):15-24.
24. Fadaee Raieneh M, Ahmadifar E, Enayat Gholampour T. 2017. Effects of dietary prebiotic Inulin on growth indices, weight gain and survival rate in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*. 30(2):194-202.
25. Finlay J, Zigmond M, Abercrombie E. 1995. Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience*. 64(3):619-28.
26. Fornaro M, Rocchi G, Escelsior A, Contini P, Martino M. 2013. Might different cytokine trends in depressed patients receiving duloxetine indicate differential biological backgrounds. *Journal of Affective Disorders*. 145(3):300-7.

27. Gunnarsson L, Jauhiainen A, Kristiansson E, Nerman O, Larsson DJ. 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental Science & Technology*. 42(15):5807-13.
28. Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*. 36(12):2452-9.
29. Hayley S, Poulter M, Merali Z, Anisman H. 2005. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*. 135(3):659-78.
30. Herculano AM, Maximino C. 2014. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 55:50-66.
31. Hinson RM, Williams JA, Shacter E. 1996. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(10):4885-90.
32. Horzmann KA, Freeman JL. 2018. Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*. 163(1):5-12.
33. Keller J, Gomez R, Williams G, Lembke A, Lazzeroni L, Murphy GM, et al. 2017. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular Psychiatry*. 22(4):527-36.
34. Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M. 2011. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 35(3):744-59.
35. Leonard B, Maes M. 2012. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 36(2):764-85.
36. Leite CE, de Oliveira Maboni L, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TCB, et al. 2013. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272(3):681-9.
37. Maes M. 1993. An evaluation of basal hypothalamic-pituitary-thyroid axis function in depression: results of a large-scaled and controlled study. *Psychoneuroendocrinology*. 18(8):607-20.
38. Maes M. 1999. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Cytokines, Stress, and Depression*. 25-46.
39. Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Galecki P, et al. 2012. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Medicine*. 10:1-19.
40. Maes M, Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J. 2011. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuroendocrinol Lett*. 32(1):7-24.
41. Maes M, Vandoolaeghe E, Ranjan R, Bosmans E, Bergmans R, Desnyder R. 1995. Increased serum interleukin-1-receptor-antagonist concentrations in major depression. *Journal of Affective Disorders*. 36(1-2):29-36.
42. Manuel R, Gorissen M, Zethof J, Ebbesson LO, van de Vis H, Flik G, et al. 2014. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: stronger effects in the resting phase than in the active phase. *Journal of Experimental Biology*. 217(21):3919-28.
43. Marcon M, Herrmann AP, Mocelin R, Rambo CL, Koakoski G, Abreu MS, et al. 2016. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology*. 233:3815-24.
44. Martinowich K, Lu B. 2008. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 33(1):73-83.
45. Mesquita AR, Correia-Neves M, Roque S, Castro AG, Vieira P, Pedrosa J, et al. 2008. IL-10 modulates depressive-like behavior. *Journal of Psychiatric Research*. 43(2):89-97.
46. Mihailova S, Ivanova-Genova E, Lukanov T, Stoyanova V, Milanova V, Naumova E. 2016. A study of TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, and IFN- γ gene polymorphisms in patients with depression. *Journal of Neuroimmunology*. 293:123-8.
47. Minghetti L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 63(9):901-10.
48. Mocelin R, Marcon M, D'ambros S, Mattos J, Sachett A, Siebel AM, et al. 2019. N-acetylcysteine reverses anxiety and oxidative damage induced by unpredictable chronic stress in zebrafish. *Molecular Neurobiology*. 56:1188-95.

49. Müller N, Myint A-M, Schwarz MJ. 2009. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders-relation to drug treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 11(3):319-32.
50. Nobis A, Zalewski D, Waszkiewicz N. 2020. Peripheral markers of depression. *Journal of Clinical Medicine*. 9(12):3793.
51. Noble S, Benfield P. 1997. Citalopram: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the treatment of depression. *CNS Drugs*. 8:410-31.
52. Nielsen SV, Kellner M, Henriksen PG, Olsén H, Hansen SH, Baatrup E. 2018. The psychoactive drug Escitalopram affects swimming behaviour and increases boldness in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*. 27:485-97.
53. Piato ÂL, Capiotti KM, Tamborski AR, Osés JP, Barcellos LJ, Bogo MR, et al. 2011. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 35(2):561-7.
54. Pomara N, Willoughby LM, Sidtis JJ, Cooper TB, Greenblatt DJ. 2005. Cortisol response to diazepam: its relationship to age, dose, duration of treatment, and presence of generalized anxiety disorder. *Psychopharmacology*. 178:1-8.
55. Ramsay JM, Feist GW, Varga ZM, Westerfield M, Kent ML, Schreck CB. 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*. 258(1-4):565-74.
56. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, et al. 2006. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR* D report. *American Journal of Psychiatry*. 163(11):1905-17.
57. Sapolsky RM, Krey LC, Mcewen BS. 1984. Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology*. 114(1):287-92.
58. Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. 2005. Cytokines and major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 29(2):201-17.
59. Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39(5):384-90.
60. Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. 2015. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*. 16(6):317-31.
61. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1):44-84.
62. Varela M, Dios S, Novoa B, Figueras A. 2012. Characterisation, expression and ontogeny of interleukin-6 and its receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental & Comparative Immunology*. 37(1):97-106.
63. Wang H, Li P, Zhang Y, Zhang C, Li K, Song C. 2020. Cytokine changes in different types of depression: specific or general? *Neurology, Psychiatry and Brain Research*. 36:39-51.
64. Więdołcha M, Marcinowicz P, Krupa R, Janoska-Jaździk M, Janus M, Dębowska W, et al. 2018. Effect of antidepressant treatment on peripheral inflammation markers—A meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 80:217-26.
65. World Health Organization. 2017. Other common mental disorders: global health estimates. Geneva: World Health Organization. 24(1).
66. Zhao Y, Wang Z, Dai J, Chen L, Huang Y, Zhan Z. 2012. Beneficial effects of benzodiazepine diazepam on chronic stress-induced impairment of hippocampal structural plasticity and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*. 228(2):339-50.
67. Zhu C, Zhang T, Li Q, Chen X, Wang K. 2023. Depression and anxiety during the COVID-19 pandemic: epidemiology, mechanism, and treatment. *Neuroscience Bulletin*. 39(4):675-84.
68. Zimmermann F, Altenhofen S, Kist L, Leite C, Bogo M, Cognato G, et al. 2016. Unpredictable chronic stress alters adenosine metabolism in zebrafish brain. *Molecular Neurobiology*. 53:2518-28.

Effects of Diazepam and Escitalopram on Stress and the Expression of Pro- and Anti-Inflammatory Genes in Zebrafish (*Danio rerio*) as an Alternative to the Human Model

Ali Tahamtan nezhad Emran¹, Hamed Manouchehri*¹, Reza Changizi¹, Shahab Tirgar Fakheri¹, Mohadeseh Najarzadeh¹, Meysam Rameshgar²

¹ Department of Veterinary, Bab.C., Islamic Azad University, Babol, Iran

² Department of Biology, Bab.C., Islamic Azad University, Babol, Iran

Abstract

Depression is a mental disorder that, according to statistics, is becoming more serious every day, highlighting the increasing need for research on depression models and the development of antidepressant drugs. The aim of this study was to evaluate the individual and combined effects of diazepam and escitalopram on biochemical and molecular parameters in zebrafish (*Danio rerio*). In the present study, the Unpredictable Chronic Stress (UCS) protocol was used to induce depression in zebrafish. Biochemical assays were conducted by measuring cortisol levels using the ELISA technique, and molecular assays were performed by analyzing the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine genes using Real-time PCR. Data analysis was conducted using the SPSS statistical software, and the statistical test of two-way repeated measures ANOVA with Tukey's post hoc test was applied. Diazepam, escitalopram, and their combination prevented the effects of depression by significantly reducing the expression of pro-inflammatory cytokine genes (TNF- α , IL-6) and also significantly lowering cortisol levels (from 0.07 ± 1.01 ng cortisol per gram of tissue to 0.12 ± 0.61 ng per gram of tissue in the diazepam + escitalopram treatment). This study demonstrates that the UCS protocol induces distinct neuroendocrine changes in zebrafish, which can be alleviated using anxiolytic and antidepressant drugs. Furthermore, this study reinforces the use of zebrafish as a model organism for studying the behavioral and physiological effects of stress and shows that the UCS protocol can be used as an efficient experimental tool for evaluating new drugs used in stress-induced psychiatric disorders.

Key words: Depression, Zebrafish, Diazepam, Escitalopram, UCS Protocol